

# 淫羊藿素对人卵巢癌 A2780 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响

李秋瑞, 侯科名, 王猛, 陈蓉\*

(重庆医科大学 中医药学院, 中医药防治代谢性疾病重庆市重点实验室, 重庆 400016)

**[摘要]** 目的: 观察淫羊藿素对人上皮性卵巢癌 A2780 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响, 并探讨淫羊藿素通过调控 A2780 细胞上皮间质转化(EMT)相关分子表达抑制细胞侵袭迁移。方法: 设置空白组, 淫羊藿素低、中、高剂量组(5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )分别作用于人卵巢癌 A2780 细胞 48 h。采用细胞增殖与活性检测 CCK-8 法, 流式细胞术检测各组细胞增殖抑制率及凋亡率; 划痕实验及 transwell 迁移实验观察细胞迁移情况并计算划痕愈合率与迁移率; transwell 侵袭实验观察细胞侵袭情况并计算侵袭率; 蛋白免疫印迹法(Western blot)与实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 EMT 相关分子 E-钙黏蛋白(E-cadherin), N-钙黏蛋白(N-cadherin), 波形蛋白(Vimentin)和肿瘤侵袭迁移相关分子基质金属蛋白酶-9(MMP-9)蛋白及 mRNA 表达情况。结果: CCK-8 与流式细胞术结果显示, 与空白组比较, 淫羊藿素各组细胞抑制率显著上升( $P<0.01$ ), 细胞总凋亡率上升( $P<0.05$ ); 划痕实验及 transwell 侵袭迁移实验结果显示, 与空白组比较, 淫羊藿素组的侵袭迁移能力减弱, 细胞侵袭迁移数量和侵袭迁移率明显减少( $P<0.05$ ); Western blot 与 PCR 结果显示, 与空白组比较, 淫羊藿素各组中 N-cadherin, MMP-9, Vimentin 蛋白和 mRNA 表达总体呈下降趋势, E-cadherin 的表达呈上升趋势。结论: 淫羊藿素对人卵巢癌 A2780 细胞具有抑制增殖、促进凋亡的作用, 可能通过调控 EMT 相关分子表达抑制 A2780 细胞的侵袭迁移。

**[关键词]** 淫羊藿素; 卵巢癌 A2780; 上皮间质转化(EMT); 侵袭迁移; 增殖凋亡

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)20-0101-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20212024

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210820.1141.002.html>

**[网络出版日期]** 2021-08-20 18:16

## Effect of Icaritin on Proliferation, Apoptosis, Migration and Invasion of Human Ovarian Cancer A2780 Cells

LI Qiu-ru, HOU Ke-ming, WANG Meng, CHEN Rong\*

(Chongqing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine (TCM) for Prevention and Cure of Metabolic Diseases, College of TCM, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of icaritin on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of human epithelial ovarian cancer A2780 cells and the inhibitory mechanism of icaritin against cell invasion and migration via the regulation of epithelial-mesenchymal transformation (EMT)-related molecule expression. **Method:** A2780 cells were divided into the blank control group and low-, medium-, and high-dose (5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) icaritin groups and received the corresponding interventions for 48 h. Cell proliferation and viability were detected using the cell counting kit-8 (CCK-8). The cellular proliferation inhibition and apoptosis rates were assayed by flow cytometry. The cell invasion and migration were observed in Scratch test and transwell test, followed by the calculation of wound healing rate and migration rate. The protein and mRNA

**[收稿日期]** 20210703(004)

**[基金项目]** 重庆市科委基金项目(cstc2016shmszx130057); 重庆医科大学杏林计划-青苗工程资助项目(2021-ZDXK-M04)

**[第一作者]** 李秋瑞, 在读硕士, 从事卵巢癌方向研究, E-mail: 815440196@qq.com

**[通信作者]** \* 陈蓉, 教授, 从事卵巢癌及不孕方向研究, E-mail: cr8093@126.com

expression levels of EMT-related molecules including E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin and tumor invasion and migration-related molecule matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) were measured by Western blot and real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** As revealed by CCK-8 assay and flow cytometry, compared with the blank control group, the icaritin groups all exhibited elevated proliferation inhibition rate ( $P < 0.01$ ) and apoptosis rate ( $P < 0.05$ ). According to the Scratch test and transwell test, compared with the blank control group, the icaritin groups displayed weakened invasion and migration ability and decreased number and rate of cell invasion and migration ( $P < 0.05$ ). Western blot and Real-time PCR results showed that the protein and mRNA expression levels of N-cadherin, MMP-9 and Vimentin in each icaritin group were down-regulated as compared with those in the blank control group, while the expression of E-cadherin was up-regulated. **Conclusion:** Icaritin inhibits the proliferation and promotes the apoptosis of human ovarian cancer A2780 cells, and it inhibits the invasion and migration of A2780 cells possibly by regulating the expression of EMT-related molecules.

**[Keywords]** icaritin; ovarian cancer A2780 cells; epithelial-mesenchymal transformation (EMT); invasion and migration; proliferation and apoptosis

卵巢癌是女性生殖器常见三大恶性肿瘤之一,由于其早期症状不明显和位置隐秘,多数患者被确诊时已是晚期<sup>[1]</sup>。晚期的卵巢癌发生直接蔓延、淋巴结转移或腹腔种植,导致其5年生存率不足50%<sup>[2]</sup>。卵巢癌被认为化疗反应良好,但化疗后不良反应众多,多数患者出现化疗后不耐受,因此针对这部分患者而言,仍需探索更有效且不良反应小的其他替代药物<sup>[3]</sup>。

淫羊藿素是天然中药小檗科植物淫羊藿的有效成分之一,具有抑制肝癌<sup>[4]</sup>、肺癌<sup>[5]</sup>、乳腺癌<sup>[6]</sup>等癌细胞增殖、侵袭和迁移的作用。淫羊藿素作为晚期肝癌候选药物阿可拉定的单一成分,已完成Ⅲ期临床试验<sup>[7]</sup>。课题组在前期研究淫羊藿素对卵巢癌细胞恶性行为影响时发现,淫羊藿素可以抑制卵巢癌SKOV3细胞的增殖并促进其凋亡<sup>[8]</sup>,但针对恶性程度更高的卵巢癌A2780细胞研究较少。A2780细胞,为未分化的人上皮性卵巢癌细胞,恶性程度高,侵袭性强,生长快,早期即可发生复发和远端的转移。上皮性卵巢癌细胞主要通过跨体外传播,利用经典的侵袭-转移级联机制,通过血行-淋巴管转运,在远处器官部位增殖形成微转移或大转移。这个过程成功与否主要取决于上皮间质转化(EMT)及其关键参与分子,包括E-钙黏蛋白(E-cadherin)和N-钙黏蛋白(N-cadherin)<sup>[9]</sup>。本实验研究淫羊藿素对卵巢癌细胞A2780增殖、凋亡、迁移与侵袭的影响,以推导淫羊藿素的广谱抗癌作用,并探讨淫羊藿素通过调控EMT相关分子的表达抑制A2780细胞侵袭迁移。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人上皮性卵巢癌细胞A2780购自上海芯超生物科技有限公司,编号HOva-A2780-01,传至第3代。

**1.2 药物及试剂** 淫羊藿素(北京索莱宝科技有限公司,批号SI8020,纯度 $\geq 98\%$ );胎牛血清(FBS,重庆荣达普麦生物技术有限公司,批号04-001-1ACS);1640培养基(美国Gibco公司,批号8120320);青霉素-链霉素溶液,0.25%胰酶(不含EDTA),结晶紫染液,SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(中国上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为C0222,C0205,C0121,P0012A);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(日本同仁公司,批号CK04);Annexin-V-FITC/碘化丙啶(PI)双染色法流式细胞检测试剂盒(美国Invitrogen公司,批号V13241);二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司,批号D2650);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),波形蛋白(Vimentin),基质金属蛋白酶-9(MMP-9),E-cadherin兔多克隆抗体(美国SAB公司,批号分别为21612-2,33541-2,21677-2,40860-2);N-cadherin兔单克隆抗体(美国CST公司,批号131116);二抗(山羊抗兔,美国SAB公司,批号L3012);SteadyPure通用型RNA提取试剂盒II(艾科瑞生物科技有限公司,批号AG21022);TB Green® Premix Ex Taq™ II, PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(日本Takara公司,批号分别为RR820A,RR047A);基质胶(美国BD公司,批号356234)。

**1.3 仪器** NANODROP型2000微量核酸蛋白测

定义(美国BioTek公司);Synergy HTX全型自动酶标仪,Form371型CO<sub>2</sub>细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);BX53型倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);Odyssey Fc型双色红外荧光成像系统(美国Li-Cor公司);Mini PROTEAN® Tetra System型垂直电泳装置、湿转仪,CFX96型Touch实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司);CytoFLEX型流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司);iCEN-24R型低温高速离心机(杭州奥盛仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养及实验分组** 将A2780细胞接种于含有6 mL 10% FBS的完全培养基中(每50 mL培养基中加入10%胎牛血清,1% 100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素,0.1 g·L<sup>-1</sup>链霉素,89%1640培养基)于5%CO<sub>2</sub>,37 °C恒温孵育箱中培养,3 d后进行传代种板。根据课题组前期实验基础<sup>[8]</sup>,将A2780细胞分为空白组、淫羊藿素组(5, 10, 20 μmol·L<sup>-1</sup>),取对数生长期的细胞进行药物干预,并在作用48 h后进行检测。

**2.2 CCK-8检测细胞活性** 取96孔板按实验分组分为4组,每组设置6个复孔,选取需要传代铺板的A2780细胞,计数并调整细胞密度为5×10<sup>4</sup>个/mL,每孔加入细胞悬液100 μL,孵育箱内培养24 h。分组给药处理48 h,在避光条件下,每孔加入CCK-8试剂液10 μL,孵育箱内孵育3.5 h,避光取出,仪器检测各组的吸光度A。重复3次以上,根据A计算增殖抑制率。细胞增殖抑制率=(A<sub>空白组</sub>-A<sub>药物组</sub>)/A<sub>空白组</sub>×100%。

**2.3 流式细胞术检测细胞凋亡** 选取呈对数生长期的A2780细胞接种于6孔板上,按照药物分组每组设置3个复孔,孵育箱内培养24 h后按照药物分组给药,处理48 h,用不含EDTA的0.25%胰酶消化后收集细胞。800 r·min<sup>-1</sup>离心4 min(离心半径6 cm),重悬细胞。避光向离心管中加入Binding-buffer 100 μL,Annexin-V-FITC和PI各2 μL,混匀后室温静置5 min。流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。重复3次以上,计算每组细胞凋亡率。

**2.4 划痕实验检测细胞横向迁移情况** 取2个6孔板,用记号笔在孔板背面每隔0.5 cm划一条横线,保证每个孔至少有3条横线穿过。将呈对数生长期的A2780细胞按照1.5×10<sup>6</sup>个/孔接种于6孔板内,24 h后观察细胞铺满整个孔板。将细胞分为空白组、淫羊藿素组,每组设置3个复孔。用1 mL枪头靠着直尺垂直于背面横向划竖线,每孔3条竖线。取横竖线交点处于显微镜下拍照,记为0 h。药物作

用48 h后,将6孔板从孵育箱内取出拍照,记为48 h。采用Image J软件计算划痕面积,划痕愈合率=(S<sub>0h划痕面积</sub>-S<sub>48h划痕面积</sub>)/S<sub>0h划痕面积</sub>。

**2.5 transwell迁移实验检测各组细胞纵向迁移情况** 取对数生长期细胞接种于12孔板内,分别为空白组和淫羊藿素组,每组3个复孔。孵育24 h,按照不同组别加药,作用48 h,取作用后的细胞用无血清的1640培养基分别配成2.5×10<sup>5</sup>个/mL细胞悬液,将小室放入24孔板内,下室加入含20% FBS的培养基750 μL,上室加入细胞悬液200 μL,孵育箱内培养48 h。移去培养基,PBS润洗2次,去除上室未迁移细胞,甲醛固定30 min,移去甲醛,PBS润洗2次,结晶紫染液避光染色30 min,PBS润洗2次,棉签擦干上室内未迁移细胞,光学显微镜下拍照。采用Image J软件自动计数细胞数量。

**2.6 transwell侵袭实验检测各组细胞侵袭情况** 细胞分组及加药培养同2.5项,作用48 h。用不含血清的培养基按照1:8的比例稀释基质胶,向小室内加入稀释后的基质胶100 μL,37 °C孵育箱内5 h,待其成胶。取作用后的细胞用无血清的1640培养基分别配成2.5×10<sup>5</sup>个/mL细胞悬液,下室加入含20% FBS的培养基750 μL,上室加入细胞悬液200 μL,孵育箱内培养48 h。移去培养基及基质胶,PBS润洗2次,去除上室未侵袭细胞,甲醛固定30 min,PBS润洗2次,结晶紫染液避光染色30 min,PBS润洗2次,棉签擦干上室内未侵袭细胞,光学显微镜下拍照。运用Image J软件自动计数细胞数量。

**2.7 蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测EMT和肿瘤侵袭迁移相关蛋白表达** 取对数生长期的A2780细胞接种于T75培养瓶内,孵育箱内培养24 h,按照药物分组作用细胞48 h,收集细胞,并向每管细胞中加入200 μL裂解液,于冰上静置1 h,期间每15 min吹打100次。4 °C,15 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,转移上清至新1.5 mL离心管。按BCA法测定蛋白浓度,并配平。8% SDS-PAGE凝胶电泳,切胶、转膜,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,TBST洗3次,加入N-cadherin, E-cadherin, MMP-9, Vimentin一抗(1:1 000),4 °C孵育过夜。洗膜,孵二抗,TBST洗3次后发光拍照。Image J软件分析条带灰度值,GAPDH作为内参,计算各蛋白相对表达水平。

**2.8 Real-time PCR检测EMT和肿瘤侵袭迁移相关mRNA表达** 细胞接种于6孔板中,培养24 h后按分组用药干预48 h,按照艾科瑞生物公司的通用型RNA提取试剂盒说明书提取总RNA,仪器检测

提取结果,观察是否存在污染,并确定各组 RNA 浓度,进行逆转录操作,反应条件:37 °C, 15 min; 85 °C, 5 s; 4 °C 保存,内参选取 GAPDH,进行 PCR 扩增反应,反应条件:预变性 95 °C, 1 min; 变性 95 °C, 30 s; 退火 60 °C, 30 s; 延伸 72 °C, 30 s; 共设置 39 个循环,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法统计结果。引物序列由北京擎科新业生物技术有限公司合成。N-cadherin(229 bp): 上游 5'-AGGACAGCCTCTTCTCAATGT-3', 下游 5'-TAAGGTTGGCTTCAGGCTCA-3'; E-cadherin(153 bp): 上游 5'-TGCCTGAGAACGAGGCTAAC-3', 下游 5'-TGCCATCGTTGTTCACTGGA-3'; MMP-9(111 bp): 上游 5'-CAGTACCGAGAGAAAGCC TATT-3', 下游 5'-CAGGATGTCATAGGTCACGT AG-3'; Vimentin(178 bp): 上游 5'-GGACCAGCTAA CCAACGACA-3', 下游 5'-AAGGTCAAGACGTG CCAGAG-3'; GAPDH(119 bp): 上游 5'-TCTGACTTCAACAGCG ACACC-3', 下游 5'-CTGTTGCTGTAGCCAAATTC GTT -3'。

**2.9 统计学分析** 使用 SPSS 25.0 软件对实验所得数据进行统计,计量资料结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间比较用独立样本 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 淫羊藿素对 A2780 细胞增殖的影响 与空白

表 2 淫羊藿素作用 A2780 细胞 48 h 对细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 2 Apoptosis rate of A2780 cells treated with icariin for 48 h ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	正常细胞	早凋细胞	晚凋细胞	坏死细胞
空白		97.10±0.79	1.27±0.39	1.56±0.43	0.08±0.02
淫羊藿素	5	92.38±1.43 <sup>2)</sup>	2.77±0.58 <sup>2)</sup>	4.74±0.83 <sup>2)</sup>	0.10±0.08
	10	86.66±2.16 <sup>2)</sup>	3.12±1.35 <sup>1)</sup>	9.84±2.74 <sup>2)</sup>	0.39±0.12 <sup>2)</sup>
	20	68.90±3.57 <sup>2)</sup>	3.79±2.44	26.19±2.64 <sup>2)</sup>	1.13±0.31 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 2, 5~7 同)。

表 3 淫羊藿素处理 A2780 细胞 48 h 后对细胞划痕愈合率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 3 Scratch healing rate of A2780 cells treated with icariin for 48 h ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	划痕愈合率/%
空白		55.80±2.75
淫羊藿素	5	45.00±4.79 <sup>1)</sup>
	10	35.80±4.19 <sup>1)</sup>
	20	25.38±7.34 <sup>1)</sup>

#### 3.4 淫羊藿素对 A2780 细胞纵向迁移的影响 与空白组比较,淫羊藿素各组的细胞迁移数量和细胞迁

移率显著减少( $P < 0.01$ )。见表 4, 图 2。

表 1 淫羊藿素作用 A2780 细胞 48 h 对细胞增殖抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

Table 1 Inhibition rate of cell proliferation of A2780 cells treated with icariin for 48 h ( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$A_{450 \text{ nm}}$	抑制率/%
空白		1.44±0.11	
淫羊藿素	5	1.26±0.07 <sup>1)</sup>	12.07±4.03 <sup>1)</sup>
	10	0.88±0.07 <sup>1)</sup>	39.03±2.38 <sup>1)</sup>
	20	0.63±0.04 <sup>1)</sup>	49.84±0.82 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ (表 3, 4 同)。

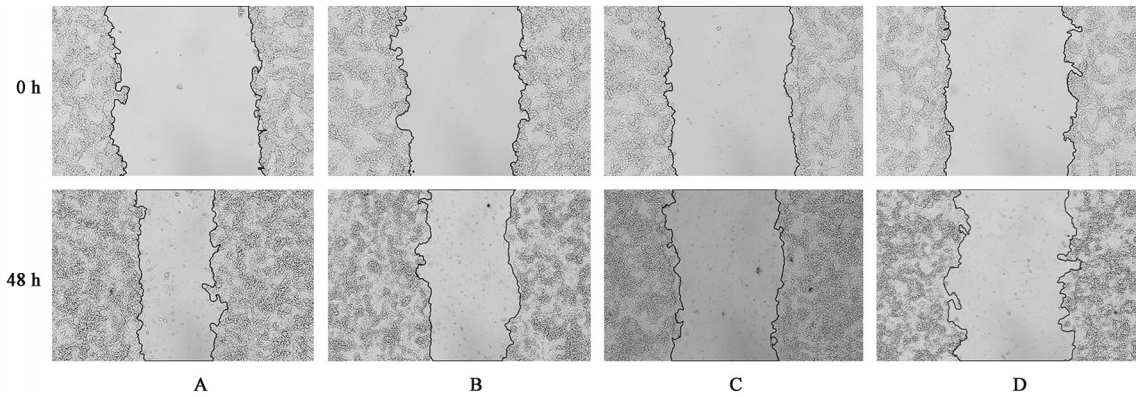
**3.2 淫羊藿素对 A2780 细胞凋亡的影响** 与空白组比较,淫羊藿素高、中、低浓度组细胞总凋亡率均上升,其中以晚凋细胞变化最显著,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ),说明淫羊藿素对 A2780 细胞凋亡的影响,主要集中在促进细胞的晚期凋亡。见表 2。

**3.3 淫羊藿素对 A2780 细胞横向迁移的影响** 与空白组比较,淫羊藿素各组的划痕愈合率和横向迁移水平均有下降,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 3, 图 1。

**3.5 淫羊藿素对 A2780 细胞侵袭的影响** 与空白组比较,淫羊藿素各组细胞侵袭数量和细胞侵袭率明显减少( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 5, 图 2。

**3.6 淫羊藿素对 A2780 细胞相关蛋白表达的影响** 与空白组比较,淫羊藿素各组中 E-cadherin 蛋白表达明显上升( $P < 0.05$ );淫羊藿素 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组 N-cadherin, MMP-9, Vimentin 蛋白表达明显下降( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 3, 表 6。

**3.7 淫羊藿素对 A2780 细胞 EMT 和肿瘤侵袭迁移相关 mRNA 表达的影响** 与空白组比较,淫羊藿素



A. 空白组; B~D. 淫羊藿素 5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组 (图 2, 3 同)

图 1 淫羊藿素处理 A2780 细胞 48 h 对细胞划痕愈合的影响 (划痕,  $\times 100$ )

Fig. 1 Scratch healing of A2780 cells treated with icaritin for 48 h (scratches,  $\times 100$ )

表 4 淫羊藿素处理 A2780 细胞 48 h 对细胞迁移情况的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

Table 4 Cell migration of A2780 cells treated with icaritin for 48 h ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	迁移数量/个	迁移率/%
空白		438.67 $\pm$ 28.11	100.00
淫羊藿素	5	355.17 $\pm$ 20.82 <sup>1)</sup>	81.02 $\pm$ 2.22 <sup>1)</sup>
	10	276.17 $\pm$ 11.44 <sup>1)</sup>	63.04 $\pm$ 1.80 <sup>1)</sup>
	20	193.17 $\pm$ 5.81 <sup>1)</sup>	44.12 $\pm$ 1.67 <sup>1)</sup>

表 5 淫羊藿素处理 A2780 细胞 48 h 对细胞侵袭情况的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

Table 5 Cell invasion of A2780 cells treated with icaritin for 48 h ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	侵袭数量/个	侵袭率/%
空白		237.17 $\pm$ 15.89	100.00
淫羊藿素	5	212.83 $\pm$ 6.11 <sup>1)</sup>	89.97 $\pm$ 4.34 <sup>2)</sup>
	10	162.50 $\pm$ 7.79 <sup>2)</sup>	68.62 $\pm$ 2.44 <sup>2)</sup>
	20	109.33 $\pm$ 15.08 <sup>2)</sup>	46.09 $\pm$ 5.55 <sup>2)</sup>

20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组 N-cadherin, MMP-9, Vimentin mRNA 表达显著降低, 差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ ); 淫羊

藿素组 E-cadherin mRNA 表达显著升高, 差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ )。见表 7。

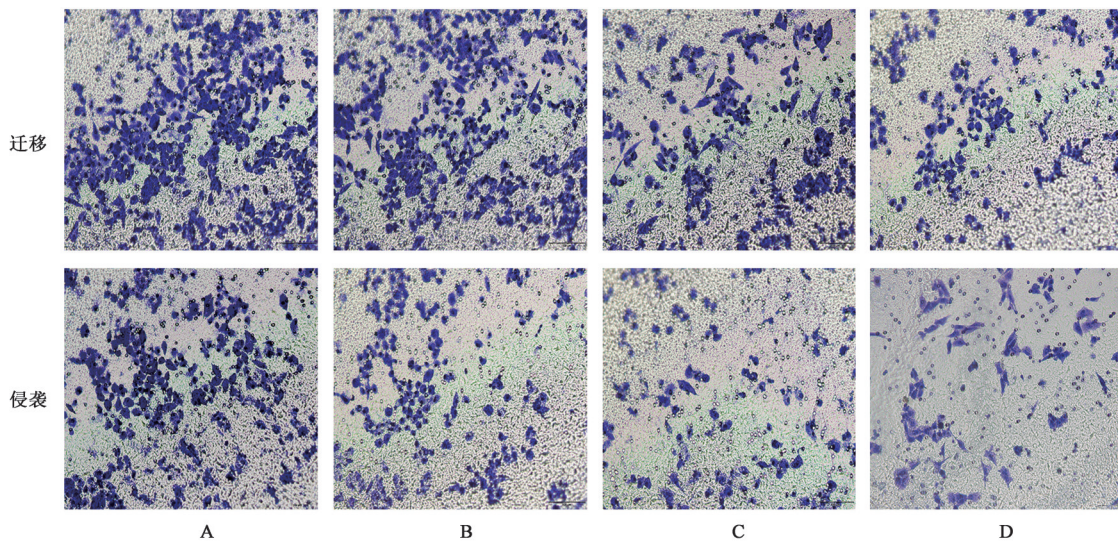


图 2 淫羊藿素处理 A2780 细胞 48 h 对细胞侵袭迁移情况的影响 (结晶紫染色,  $\times 200$ )

Fig. 2 Cell invasion and migration of A2780 cells treated with icaritin for 48 h (crystal violet staining,  $\times 200$ )

#### 4 讨论

卵巢癌是妇科常见肿瘤, 被称为“沉默的杀手”, 由于其起病隐匿, 早期症状不明显, 有接近 70% 的患者发展到 III, IV 期时才被确诊<sup>[10]</sup>, 且晚期

的卵巢癌多数已发生远端的转移, 临床上手术治疗和化疗难度较大, 不良反应众多, 预后不佳。A2780 细胞作为未分化的癌细胞, 是卵巢癌细胞中恶性程度最高的细胞系之一, 具有侵袭性强, 早期转移, 复

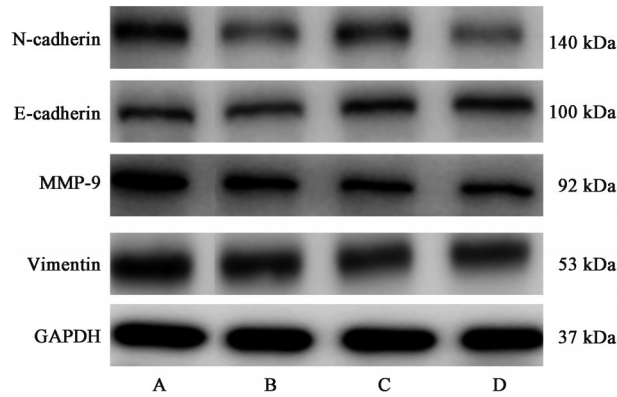


图3 淫羊藿素处理 A2780 细胞 48 h EMT 相关蛋白表达电泳  
Fig. 3 Electrophoresis of EMT-related proteins in A2780 cells treated with icariin for 48 h

发率高,病情发展迅速,治疗难度大等特点。天然草本中药淫羊藿具有补肾阳强筋骨等作用,淫羊藿素是淫羊藿的黄酮类提取物<sup>[11]</sup>,根据体内外研究的数据表明,淫羊藿素对宫颈癌、乳腺癌、肝癌和肺癌等癌症具有抗癌活性,并通过促进肿瘤细胞的凋亡坏死、诱导细胞周期停滞、干预肿瘤相关信号通路、抑制肿瘤侵袭转移和增强自身免疫力等机制发挥抗肿瘤作用<sup>[12-15]</sup>。有研究表明,淫羊藿素可能通过激活相关信号通路对非小细胞肺癌 A549 细胞产生抗癌活性<sup>[16]</sup>。TAO 等<sup>[17]</sup>发现,淫羊藿素抑制乳腺癌的恶性行为与雌激素受体有关,并提出在临床应用中应考虑淫羊藿素对雌激素的作用。卵巢癌与乳腺癌均为雌激素依赖性肿瘤,并且大量实验研究表明,淫羊藿素对于肿瘤细胞的恶性行为具有抑制作用,包括抑制增殖,促进凋亡等。

癌症的发展与癌细胞侵袭转移关系密切,控制

癌症的侵袭转移可以提高患者生存率、延缓癌症进程、减少放化疗次数和改善患者生活质量。研究表明,MMP-9 的表达与多种肿瘤的侵袭转移成正相关<sup>[18]</sup>。另外,EMT 在促进肿瘤侵袭迁移中也扮演着重要角色<sup>[19]</sup>。上皮间质转化是上皮细胞转变为具有运动特性的间充质细胞的过程,在发育和伤口愈合中不可或缺,并在病理上促进纤维化和癌症进展<sup>[20]</sup>。EMT 被定义为上皮性标志物 E-cadherin 的缺失和间质性标志物 Vimentin, N-cadherin 表达的上调<sup>[21]</sup>。李智慧等<sup>[22]</sup>发现通过抑制 EMT 的进程可以抑制肺癌细胞的转移和侵袭。另有学者研究发现 EFEMP2 通过上调或下调 EMT 标志物的表达影响膀胱癌的进展和转移<sup>[23]</sup>。EMT 因此成为抗癌治疗的首要目标<sup>[24]</sup>。

本课题通过体外实验研究淫羊藿素干预人卵巢癌 A2780 细胞 48 h 后增殖抑制和细胞凋亡情况。CCK-8 结果表明,淫羊藿素高剂量组对卵巢癌细胞的增殖抑制率接近 50%,流式细胞术显示淫羊藿素对卵巢癌细胞的促凋亡作用主要集中在晚期凋亡,并且随着浓度的增加凋亡率逐渐上升。本实验结果显示,与空白组比较,淫羊藿素能同时下调 N-cadherin, Vimentin 和 MMP-9 的表达,并上调上皮性标志物 E-cadherin 的表达。表明淫羊藿素对卵巢癌细胞 A2780 侵袭迁移的影响可能是通过 EMT 途径实现的。

综上,淫羊藿素对卵巢癌 A2780 细胞具有抑制增殖、促进凋亡,并可能通过 EMT 途径抑制其侵袭迁移。卵巢癌的临床手术治疗和放化疗方法已近乎成熟,而对于不能接受手术或放化疗的患者来

表6 淫羊藿素对 A2780 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 6 Effect of icariin on expression of EMT-related proteins in A2780 cells ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	N-cadherin/GAPDH	E-cadherin/GAPDH	MMP-9/GAPDH	Vimentin/GAPDH
空白		1.21±0.06	0.31±0.05	0.95±0.04	0.49±0.06
淫羊藿素	5	1.00±0.19 <sup>1)</sup>	0.39±0.05 <sup>1)</sup>	0.75±0.26	0.44±0.08
	10	0.96±0.23	0.47±0.14 <sup>1)</sup>	0.79±0.15	0.44±0.07
	20	0.74±0.09 <sup>2)</sup>	0.54±0.19 <sup>1)</sup>	0.50±0.27 <sup>1)</sup>	0.30±0.13 <sup>1)</sup>

表7 淫羊藿素对 A2780 细胞 EMT 相关 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of icaritin on expression of EMT-related mRNA in A2780 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	N-cadherin	E-cadherin	MMP-9	Vimentin
空白		1.59±0.04	0.72±0.19	0.90±0.16	1.03±0.04
淫羊藿素	5	1.45±0.06 <sup>1)</sup>	0.91±0.08	0.77±0.27	1.02±0.05
	10	1.34±0.06 <sup>2)</sup>	1.13±0.04 <sup>1)</sup>	0.55±0.11 <sup>1)</sup>	0.96±0.05
	20	0.71±0.13 <sup>2)</sup>	2.09±0.40 <sup>2)</sup>	0.20±0.03 <sup>2)</sup>	0.42±0.03 <sup>2)</sup>

说,保守治疗方面仍具有较大发展前景。目前国家政策提倡发展祖国医学,对于中医药的推广与研究十分有利,以天然产物为来源的新型治疗方法的研究正在不断进行与完善。本实验为卵巢癌临床保守治疗的新药开发提供实验基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 李亚南,杜晓冰,鲁丰华,等. miR-19b对卵巢癌细胞侵袭和迁移的作用探讨[J]. 现代肿瘤医学,2020,28(1):9-12.

[2] SONG Z, ZHOU Y, BAI X, et al. A practical nomogram to predict early death in advanced epithelial ovarian cancer[J]. *Front Oncol*, 2021, doi: 10.3389/FONC.2021.655826.

[3] GURUNG A, HUNG T, MORIN J, et al. Molecular abnormalities in ovarian carcinoma: clinical, morphological and therapeutic correlates [J]. *Histopathology*, 2013,62(1):59-70.

[4] LI H, LIU Y, JIANG W, et al. Icaritin promotes apoptosis and inhibits proliferation by down-regulating AFP gene expression in hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2021,21(1):318-329.

[5] ZHAO X, LIN Y, JIANG B, et al. Icaritin inhibits lung cancer-induced osteoclastogenesis by suppressing the expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  and through AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Anticancer Drugs*, 2020,31(10):1004-1011.

[6] YIN L, QI X W, LIU X Z, et al. Icaritin enhances the efficacy of cetuximab against triple-negative breast cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2020,19(6):3950-3958.

[7] MO D, ZHU H, WANG J, et al. Icaritin inhibits PD-L1 expression by targeting protein I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  [J]. *Eur J Immunol*, 2021,51(4):978-988.

[8] 侯科名,李秋瑞,杨琴,等. 淫羊藿素对人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖抑制及促凋亡作用[J]. 中国中药杂志,2021,46(1):183-189.

[9] 袁少艳,何秀萍. 上皮-间质转化(EMT)在上皮性卵巢癌的作用[J]. 中国生育健康杂志,2020,31(6):588-589,593.

[10] STEWART C, RALYEA C, LOCKWOOD S. Ovarian cancer: an integrated review [J]. *Semin Oncol Nurs*, 2019,35(2):151-156.

[11] 孙彦君,陈豪杰,赵晨,等. 淫羊藿素制备方法、制剂新技术研究进展[J]. 中成药,2021,43(3):717-722.

[12] GAO L, CHEN M, OUYANG Y, et al. Icaritin induces ovarian cancer cell apoptosis through

activation of p53 and inhibition of Akt/mTOR pathway [J]. *Life Sci*, 2018,202:188-194.

[13] LIU Y, SHI L, LIU Y, et al. Activation of PPAR $\gamma$  mediates icaritin-induced cell cycle arrest and apoptosis in glioblastoma multiforme [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018,100:358-366.

[14] LU X, XUE B, ZHANG T, et al. Down-regulation of microRNA-10a mediates the anti-tumor effect of icaritin in A549 cells via the PTEN/Akt and ERK pathway [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2019, 38 (6) : 525-533.

[15] YANG X J, XI Y M, LI Z J. Icaritin: a novel natural candidate for hematological malignancies therapy [J]. *Biomed Res Int*, 2019,doi:10.1155/2019/4860268.

[16] 张瑶,张汀荣,薛蓓云. 淫羊藿素对非小细胞肺癌细胞增殖、凋亡、侵袭力的影响[J]. 中国临床医生杂志,2018,46(6):704-707.

[17] TAO C C, WU Y, GAO X, et al. The antitumor effects of icaritin against breast cancer is related to estrogen receptors [J]. *Current Mol Med*, 2020, 21 (1):73-85.

[18] PAKRAVAN N, ABBASI A, HASSAN Z M. Immunotherapy using oxygenated water and tumor-derived exosomes potentiates antitumor immune response and attenuates malignancy tendency in mice model of breast cancer [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, doi: 10.1155/2021/5529484.

[19] 张彦璐,陈影,应国清. 上皮间质转化在肿瘤侵袭转移中的研究进展[J]. 浙江化工,2019,50(7):11-15.

[20] LAMOUILLE S, XU J, DERYNCK R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014,15(3):178-196.

[21] PASTUSHENKO I, BLANPAIN C. EMT transition states during tumor progression and metastasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2019,29(3):212-226.

[22] 李智慧,姚菲菲,王富霞. miR-30a通过靶向调控 ZEB2 抑制非小细胞肺癌的迁移与侵袭[J]. 现代肿瘤医学,2021,29(11):1840-1846.

[23] ZHOU Q, CHEN S, LU M, et al. EFEMP2 suppresses epithelial-mesenchymal transition via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in human bladder cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(10):2139-2155.

[24] MARCUCCI F, STASSI G, DE MARIA R. Epithelial-mesenchymal transition: a new target in anticancer drug discovery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016,15(5):311-325.

[责任编辑 张丰丰]